

综 述

同工酶在马铃薯遗传育种上的应用研究

纪颖彪 屈冬玉

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所 北京 100081)

1 前 言

同工酶 (isozyme) 是指来源相同、催化反应相同而结构不同的酶分子类型, 它具有组织、发育和种 (品种) 间特异性。最早是由 Market 和 Moller(1959)提出这一名词^[1]。大量研究证实同工酶是生物界普遍存在的现象, 并且在生理学、发育学、分类学、病理学和遗传育种学中得到广泛的应用。在马铃薯研究方面, Zwartz (1966)、Leeschke 和 Stegemann (1966)、Desboroughs 和 Peloquin(1968)最早应用同工酶标记进行马铃薯品种鉴别^[2-4]。八十年代以来同工酶在马铃薯遗传育种方面的应用研究取得长足进展。

2 主要研究进展

2.1 利用同工酶标记进行马铃薯品种鉴别

品种鉴别一直是育种工作者所关注的一个基本问题。通常品种鉴别主要依据块茎类型 (如皮色、形状和肉色), 另外也可用植株形态、生长习性、叶形、花色和抗病性等特征进行品种鉴别。但这些形态标记易受环境影响以及观察时人为因素的干扰, 所以误

差较大。另外, 采用田间鉴定所需时间较长、占地多。由于同工酶具有多态性、共显性表达、无上位性、表达不受环境影响的特点, 而且许多同工酶可在块茎和幼苗中表达, 因此应用同工酶标记可以在早期快速、准确地进行马铃薯品种鉴别。最早 Zwartz (1968)、Desboroughs 和 Peloquin (1968)以块茎蛋白质和酯酶同工酶为标记进行马铃薯品种鉴定。其后 Oliver 和 Martinez-zapater (1985) 分析了 25 种同工酶, 在所鉴别的 74 个马铃薯品种中 68 个可被区分出来^[5]。Douches 和 Ludlam(1991)用水平淀粉凝胶电泳分析了 16 个同工酶位点, 并以此来鉴别 112 个已命名的品种和高世代育种品系^[6]。结果表明所有通过有性杂交育成的品种 (品系) 能用它们总的电泳图谱区分开来, 而起源于芽变 (sport) 和无性系选择 (line selection) 所有成的品种 (品系) 与原来的母系酶谱相同而无法区分。早期的研究者只是根据某种同工酶带是否出现来区别不同的品种。而 Douches 等把每个品种每个位点的基因型转化为计算机数据, 用每一个品种总的电泳图谱结构建其指纹 (finger print), 这样可通过计算机以指纹为标准进行马铃薯品种鉴别和分类。对铃薯指纹贡献最大的位点是 Mdh-1 (苹果酸脱氢酶)、

PGM-1 (磷酸葡萄糖变位酶)、Aps-1 (酸性磷酸酯酶)、Prx-3 (过氧化物酶), 这些位点每一个至少有 3 个等位基因, 并且频率大于 5%。由于马铃薯是无性繁殖, 杂合和纯合的基因型都被固定, 这就扩大了可用来进行分类的同工酶基因型数目。另外由于栽培马铃薯是四倍体, 基因剂量效应明显, 如一个二聚体酶位点 Mdh-1, 具有五种基因型: 零式两种 ($Mdh-1^11^11^11$) 和 $Mdh-1^21^21^21$)、单式两种 ($mdh-1^11^11^12$ 和 $Mdh-1^21^21^11$)、复式一种 ($Mdh-1^11^11^21$)。根据酶带染色强度 (基因剂量效应) 可把这几种基因型区分开来, 这样进一步增强了区别马铃薯品种的能力。

近年来随着 DNA 酶切及扩增技术的发展, 采用 RFLP (限制性片段长度多态性, Restriction Fragment Length Polymorphisms) 和 RAPD (随机扩增多态性 DNA, Random Amplified Polymorphic DNA) 技术可更有效地进行品种鉴别。特别是 RFLP 和 RAPD 可鉴别同工酶分析无法确定的通过芽变和无性系选择所获得的品种 (品系)。但这些技术要求较多的时间、费用和技能。需强调的是在利用同工酶作标记时仍应结合形态特征的鉴别, 二者应互为补充。

2.2 利用同工酶标记识别体细胞杂种植株

马铃薯的许多野生种具有抗病性基因, 如抗卷叶病毒 (leaf roll virus) 和抗晚疫病 (late blight) 基因。但这些野生种 (*Solanum brevidens*, *Solanum chacoense*, *Solanum phureja*) 通常与栽培种有性杂交部分或完全不亲和, 通过原生质体培养和体细胞杂交可克服这一问题^[22]。另外还可利用花药培养或孤雌生殖 (parthenogenesis) 诱导的双单倍体 (dihaploid) 和单单倍体 (monohaploid) 克服许多二倍体野生种所涉及的倍性操作问题。体细胞杂交所需解决的一个基本问

题是体细胞杂种植株的识别。国内外许多研究者都采用同工酶技术识别体细胞杂种。这一方法快速、简便、检测所需材料较少。由于同工酶是共显性表达, 杂种植株表现双亲的酶谱易于区别。Austins et al (1987) 以过氧化物酶同工酶^[8]、Hein 和 Schieder (1986) 以对过氧化物酶和酯酶同工酶^[9]、Uijtewaai 等 (1987b) 以苹果酸脱氢酶同工酶为标记进行体细胞杂种识别^[10]。Waara 等 (1989) 以 5 种同工酶系统 [磷酸葡萄糖变位酶 (PGM)、磷酸葡萄糖异构酶 (PGI)、酯酶 (EST)、苹果酸脱氢酶 (MDH)、异柠檬酸脱氢酶 (IDH)] 识别体细胞杂种取得了很好的结果^[11]。在以同工酶为标记识别体细胞杂种时, 应注意有时体细胞变异也能引起同工酶酶谱的变化^[12,13]。采用几种同工酶系统可排除体细胞变异引起的误差。应用同工酶标记识别体细胞杂种时还应结合 DNA 含量测定以及杂种核型的识别。

2.3 利用同工酶标记识别马铃薯双单倍体 (dihaploid)

通过种间杂交可低频率在 *Solanum tuberosum* 中诱导出双单倍体^[14]。而有效地鉴别双单倍体一直是人们努力研究的课题。目前通常采用 *Solanum phureja* PI225682 的三个系 (1, 13 和 22)^[15] 以及 IVP35, IVP48, IVP101 作为诱导者^[16], 诱导 *Solanum tuberosum* 孤雌生殖产生双单倍体。由于诱导者具有显性纯合的紫色胚轴标记基因 (purple hypocotyl marker, PP) 和一个显性胚斑点标记基因 (dominant embryo spot marker, BB), 利用这些标记基因可把双单倍体同杂种后代识别开来。但实践中发现有时具有绿色胚轴 (应为二倍体) 的植株实际是三倍体或四倍体^[17]; 另外胚斑标记常常不易区别, 它的外表随遗传背景而变化^[18], 这样导致识别错误。

Chien-An Liu 和 Douches (1993) 利用同工酶为标记进行双单倍体的识别取得了很好的效果^[19]。作者以 *Solanum phureja* 1.22 为诱导者, 其同工酶基因型在 PGM-2 和 MDH-1 位点为杂合体 (PGM-2¹2² 和 MDH-1¹1²)。其中, 等位基因 PGM-2¹ 为诱导者 *S. phureja* 1.22 所特有。如果授粉后的幼苗带有 PGM-2¹ 基因, 可认定其为杂种植株 (4x 或 3x), 而非双单倍体。另外多数四倍体母体不具有等位基因 MDH-1¹, 因此 Mdh-1¹ 也是识别双单倍体的一个有效基因。除了以上根据特定等位基因同工酶有无识别双单倍体外, 同工酶共显性位点的带型和位点内基因剂量效应也可用来识别双单倍体。利用同工酶标记基因识别双单倍体同根据视觉识别 (利用 P 和 B 基因) 相比, 前者具有简单、所需试材少 (100 mg 鲜样) 而且可早期进行鉴别的优点。由于马铃薯存在大量自然发生的等位基因^[6], 使用同工酶标记可提高识别效率。

2.4 马铃薯同工酶位点的连锁关系和基因定位

基因的连锁关系及其在染色体上的定位对于马铃薯遗传育种研究有十分重要的意义。由于同工酶具有其显性表达的特点, 比形态标记易识别。如果能确定它们之间的连锁关系和在染色体上的位置, 可利用这些同工酶标记来研究许多遗传、育种和进化问题。通过基因定位确立靠近着丝点的同工酶位点, 可以利用这些位点进行半四分体分析 (half-tetrad analysis, HTA)^[20] 来确定 2n 卵形成机制^[21] 和减数分裂突变体的特征 (例如: sy3 / sy3, ps / ps 突变)^[22]。在育种应用上, 如能确定一个具有许多可识别位点的二倍体分离群体, 这样就会在同工酶标记基因和重要的农艺性状间建立连锁关系 (QTL 帮助下的分子育种技术), 从而将提高育种效率, 也有利于外源基因的导入。如

在番茄上已确立酸性磷酸酯酶 Aps-1 位点与抗线虫基因, 过氧化物酶 Prx-2 位点与雄性不育基因之间存在连锁关系^[23]。在现代马铃薯育种中提出利用 2n 配子转移杂合性, 增加外源基因的导入, 如果能确立基因与着丝点之间连锁关系, 就能够确定真正的 4x-2x FDR 后代^[24]。上述这些工作都借助于马铃薯同工酶位点研究资料的累积。

Douches 和 Quiros (1987, 1988) 以及 Quiros 和 McHale (1985) 对马铃薯同工酶位点的连锁以及基因—着丝点图距作了较深入的研究^[24~26]。确定了三个同工酶位点连锁组 (Idh-1 / Sdh-1、Prx-2 / Prx-3、6-Pgdh-3 / Dia-1)。在基因定位方面, 主要是利用 4x-2x (FDR) 杂交, 通过 HTA 来确定同工酶位点基因—着丝点图距。首先选择 4x-2x 测定组合, 4x 亲本应是零式 (nulliplex), 如以 Pgi-1 位点为例, 4x 亲本应为 Pgi-1²1²1²1²。2x 测交系应为杂合体 (Pgi-1¹1²), 并且从细胞遗传学上证明它通过平行纺锤体 (ps) 或融合纺锤体机制 (fs) 来产生 2n 花粉。如果位点紧密地与着丝点连锁 (着丝点和位点间无交换发生), 所有的四倍体后代应是单式 (simplex, Pgi-1¹1²1²1²) 型。如果此位点距着丝点较远, 四分体发生单交换, 重组频率与位点到着丝点距离呈正比, 四倍体后代包括零式 (nulliplex, Pgi-1²1²1²1², 重组后代)、复式 (duplex, pgi-1¹1²2²2², 重组后代) 和单式 (Simplex, Pgi-1¹1²1²1², 非重组后代), 由于基因剂量不同 (染色强度不同) 单式和复式可区别出来。基因—着丝点图距 = $[r(\text{复式}) + r(\text{零式})] \times 100 \text{ cm}$ (r 为频率)。Douches 等 (1987, 1988) 以上述方法测定了 10 个同工酶位点的基因—着丝粒图距, 为今后的马铃薯遗传育种研究奠定了一定的基础^[24, 25]。

2.5 利用同工酶位点为标记的 HTA 确定

2n 卵形成机制

二倍体马铃薯 2n 配子的发现, 为人们利用二倍体种质资源、扩大马铃薯栽培种的遗传背景提供了可能性。通过 FDR 产生的 2n 配子可转移大部分杂合性到四倍体中去^[27]。2n 花粉发生的细胞学机制较易观察, 而 2n 卵形成的机制由于细胞学研究大孢子发生比较困难而受到限制。利用接近着丝点的染色体标记, 通过 HTA 可确定 2n 卵形成机制。Douches 和 Quiros (1987) 确定 Got-1、Pgm-2 和 Sdh-1 与着丝点非常接近^[25]。利用这三个位点为标记, 通过 2x-4x 杂交, 可确定 2n 卵形成机制。其中 2x 亲本为杂合体 (在 Pgm-2 位点为 Pgm-2¹2²)、4x 亲本为零式 (Pgm-2¹2¹2¹2¹)。如果 FDR 发生, 所有四倍体后代为单式 (Pgm-2¹2¹2¹2²)；如果 SDR 发生, 后代应有 50% 的零式 (Pgm-2¹2¹2¹2¹) 和 50% 的复式 (Pgm-2¹2¹2¹2²)。如果后代表现为三种形式 (零式、单式、复式), 那么 2n 卵形成的机制为 FDR 和 SDR 共同发生。目前所研究的二倍体家系绝大多数 2n 卵形成机制为 SDR^[21,28]。

2.6 利用同工酶为标记的 HTA 确定二倍体马铃薯联会突变体的特征及重组频率

由于发生重组, 通过 FDR 2n 配子并不能转移 100% 的杂合性到 4x 后代中。Iwanaga 和 Peloquin (1979) 发现了联会突变基因型 (sy1)^[29], 以后陆续发现 sy2^[30], sy3^[31] 和 sy4^[32]。联会突变基因和平行纺锤体基因结合可转移 100% 的杂合性到四倍体后代^[31]。但在一些作物上发现联会突变体发生重组^[33]。利用同工酶为标记的 HTA 可确定联会突变体及其特征。在正常联会条件下, 如果基因与着丝粒距离较远而发生重组, 4x × 2x (FDR) 杂交后则产生三种基因型 (单式、零式、复式), 其中零式和复式为重组后代。在联会突变体中, 如

无重组发生, 4x × 2x 后代应为单式; 如发生重组, 后代也包括零式和复式。Douches 和 Quiros (1988) 以此方法研究联会突变体 M6。以 5 个同工酶位点为标记, 突变体重组率平均减少 89.03%, 可转移 97.94% 的杂合性到 4x-2x 后代中^[22]。

3 展 望

综上所述, 同工酶在马铃薯遗传育种上的应用已取得丰硕的成果。但还有许多工作需进一步开展。在基因定位方面, 需研究更多的同工酶位点, 构建完整的同工酶基因图谱。在育种应用上探索同工酶位点与重要经济性状的连锁关系以提高育种效率。而在国内, 同工酶在马铃薯遗传育种上的应用还未普遍开展, 首先应利用同工酶标记对国内现育成的品种进行鉴定和分类, 了解其变异程度, 指导今后的育种实践。还可开展双单倍体的鉴定及 2n 卵形成机制等基础研究工作, 推动国内马铃薯科研工作的发展。

参 考 文 献

1. Market C L and F Moller. Multiple forms of enzymes: tissue ontogenetic and species specific patterns. *Proc Natl Acad Sci*, 1959, 45: 753-763
2. Zwartz J A. Potato Varieties and their protein electrophoretogram chararistic. *Eur Potato J*, 1966, 9: 111-128
3. Leeschske V and H Stegmann. Protein der kartoffeln in Abhargigkeit Von Sorte and Virose (polyacrylamide-electrophoresis). *Phytochemistry*, 1966, 5: 985-991
4. Desboroughs S L and S J Peloquin. Potato variety identification of electrophoresis patterns of tuber proteins and enzymes. *Am Potato J*, 1968, 45: 220-229
5. Oliver J L and J M Martinez-Zapater. A genetic classification of potato cultivars based on allozyme patterns. *Theor Appl Genet*, 1985, 69: 305-311
6. Douches D S and K Ludlam. Electrophoretic characterization of North American potato cultivars. *Am Potato J*, 1991, 68: 767-780

- 7 Helgson J P, Hunt G J, Haberland G T and Austins. Somatic hybrids between *Solanum bervidens* and *Solanum tuberosum*: expression of a late blight resistance gene and potato leaf roll resistance. *Plant Cell Rep*, 1986, 3: 212~214
- 8 Austins, M A Baer, Ehlenfeldt M, Kazmierczak P J, J P Helgson. Intra-specific fusion in *Solanum tuberosum*. *Theor Appl Genet*, 1985b, 71:172~175
- 9 Hein T and O Schieder. An improved culture method of mechanically isolated heterokaryons of potato. *Plant Breed*, 1986, 97:255~260
- 10 Uijtewaal B A, Suurs Lc J M and E Jacobesen. Protoplast fusion of monohaploid ($2n=x=12$) potato clones: identification of somatic hybrids using malate dehydrogenase as a biochemical marker. *Plant Sci*, 1987b, 51:277~284
- 11 Waara S, Tegelström A, Wallin and T Eriksson. Somatic hybridization between anther-derived dihaploid clones of potato (*Solanum tuberosum* L.) and the identification of hybrid plant by isozyme analysis. *Theor Appl Genet*, 1989, 77:49~56
- 12 Cooper D B, Sears R G, Lookhauf G L and B L Jones. Heritable somaclonal variation in gliadin proteins of Wheat plants derived from immature embryo callus culture. *Theor Appl Genet*, 1986, 71: 784~790
- 13 Allicchio R, Antonioli C, Graziani L, Roncavati R, Vannini. Isozyme variation in leaf-callus regenerated plants of *Solanum tuberosum*. *Plant Sci*, 1987, 53:81~86
- 14 Hougas R W and S J Peloquin. The potential of potato haploids in breeding and genetic research. *Am Potato J*, 1958, 35: 701~707
- 15 Gabel A C. Factors affecting the frequency of haploids in the common potato (*Solanum tuberosum* L.). Ph. D. Thesis University of Wisconsin, Madison. Diss Abstr, 1963, 24: 475
- 16 Hermesen J G and J Verdenus. Selection from *Solanum tuberosum* Group Phureja of genotypes combining high-frequency haploid induction with homozygosity for embryo spot. *Euphytica*, 1973, 22: 244~259
- 17 Frandsen N O. Haploid production in a potato breeding material with intensive back crossing to wild species. *Züchter*, 1967, 37: 120~134
- 18 Caligari D D S. Methods and strategies for detecting *Solanum tuberosum* dihaploids in interspecific crosses with *S. phureja*. *Ann Appl Biol*, 1988, 112: 323~328
- 19 Chien-An Liu and D S Douches. Production of haploids of Potato (*Solanum tuberosum* sub sp. *tuberosum*) and their identification with electrophoretic analysis. *Euphytica*, 1993, 70: 113~126
- 20 Mediburu A O and S J Peloquin. Gene-centromere mapping by $4x-2x$ matings in potatoes. *Theor Appl Genet*, 1979, 54, 177~180
- 21 Douches D S and C F Quiros. Genetic strategies to determine the mode of $2n$ egg formation in diploid Potatoes. *Euphytica*, 1988, 38: 247~260
- 22 Douches D S and C F Quiros. Genetic recombination in a diploid synaptic mutant and a *Solanum tuberosum* X *S. chacoense* diploid hybrid. *Heredity*, 1988b, 60: 183~191
- 23 Rick C M. Tomato(Lycopersium) pp. 147~165. In: *Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part B*. Edited by S D Tanksley and T J Orton. Elsevier Scientific Publishers, New York (1983)
- 24 Quiros C F and N McHale. Genetic analysis of isozyme variants in diploid and tetraploid Potatoes. *Genetics*, 1985, 111: 131~145
- 25 Douches D S and Quiros C F. Use of $4x-2x$ crosses to determine gene-centromere map distance of isozyme loci in *Solanum* species. *Genome*, 1987, 29: 519~527
- 26 Douches D S and C F Quiros. Additional isozyme loci in tuber-bearing *Solanums*: Inheritance and linkage relationships. *J Hered*, 1988a, 79: 377~384
- 27 Mok D W S and S J Peloquin. Breeding value of $2n$ pollen (diplandroids) in tetraploid $\times$ diploid crosses in potatoes. *Theor Appl Genet*, 1975, 46: 307~314
- 28 Stelly D M and S J Peloquin. Diploid female gametophyte formation in 24 -chromosome potatoes: Genetic evidence for the prevalence of the second meiotic division restitution mode. *Can J Genet Cytol*, 1986, 28: 101~108
- 29 Iwanaga M and S J Peloquin. Synaptic mutant affecting only megasporogenesis in potatoes. *J Hered*, 1979, 70: 385~389
- 30 Johnston S A, Hanneman R E Jr and R W Ruhde. Identification of asynaptic variant in *Solanum commersonii*. *Am Potato J*, 1981, 58:506
- 31 Okwagwu C O and S J Peloquin. A method of transferring the intact parental genotype to the offspring via meiotic mutants. *Am Potato J*, 1981, 58: 512~513
- 32 Iwanaga W. Discovery of a synaptic mutant in potato haploids and its usefulness for potato breeding. *Theor Appl Genet*, 1984, 68: 87~93
- 33 Koduru P R K and M K Rao. Cytogenetics of synaptic mutants in higher plants. *Theor Appl Genet*, 1981, 59: 197~214